

ЧЛАНЦИ

ДУШАНКА МИЛОЈКОВИЋ-ОПСЕНИЦА, Хемијски факултет, Београд

СОРБЕНТИ У ХРОМАТОГРАФИЈИ НА ТАНКОМ СЛОЈУ

Хроматографија на танком слоју, због своје једноставности, брзине извођења и ниске цене појребне опреме, представља широко примењивану методу за одвајање, доказивање и одређивање најразличитијих органских и неорганских супстанци. Поред тога, ова метода се користи и за предвиђање понашања супстанци при условима течне хроматографије у колони под високим притиском (HPLC – High Performance Liquid Chromatography).

Основни и неодвојиви елементи једног хроматографског система су **сорбент** (стационарна фаза), **хроматографски растварач** (мобилна фаза) и испитивана супстанца, односно **сорбент**. Промена стационарне и мобилне фазе изазива промену селективности система у односу на хроматографисане супстанце, што пружа могућност одвајања различитих група једињења.

Чак и у најједноставнијим системима хроматографско понашање супстанци одређују три врсте интеракција и то: **сорбент - сорбент, сорбент - мобилна фаза и мобилна фаза - сорбент**. Врста и јачина ових узајамних дејстава последица су хемијске природе сваке од компонената хроматографског система. Уколико се услови хроматографисања одржавају сталним или се контролисано мењају, могуће је доћи до бројних информација о структури и особинама одвајаних супстанци на основу њихових ретенционих параметара.

Уобичајено је да се хроматографски системи деле на тзв. **нормално-фазне** и **реверзно-фазне** системе.

Нормално-фазне системе карактерише већа поларност стационарне фазе у односу на мобилну фазу. Под оваквим условима поларније супстанце имају ниже R_F -вредности, а повећање поларности мобилне фазе доводи до повећања R_F -вредности. Опште је прихваћено да се, у случајевима нормално-фазне хроматографије, ретенција (задржавање) одвајаних супстанци заснива на тзв. **специфичним интеракцијама** између сорбента и стационарне фазе [1]. У зависности од хемијске природе одвајаних супстанци и површине сорбента као најважније специфичне интеракције могу да се јаве следећи типови узајамних дејстава: водоничне везе, дипол-дипол, јон-дипол или донорно-акцепторске интеракције [1-3].

Реверзно-фазни системи одликују се већом поларношћу мобилне у односу на стационарну фазу.

Због тога у оваквим системима мање поларне супстанце показују јачу ретенцију, а повећање поларности мобилне фазе доводи до смањења R_F -вредности одвајаних супстанци. Сматра се да је хроматографско понашање сорбента у реверзно-фазним системима одређено његовим **неспецифичним интеракцијама** са стационарном фазом (дисперзионе и индукционе силе, односно хидрофобне интеракције) и специфичним интеракцијама са поларном мобилном фазом.

Опште је прихваћена класификација хроматографских метода према којој, у зависности од природе стационарне фазе, одвајање супстанци може да буде засновано на:

- физичкој сорпцији сорбента на површинским активним центрима честица чврстог сорбента - **адсорпциона хроматографија**;
- растварању одвајаних супстанци у течnoj стационарној фази распоређеној на неком инертном чврстом носачу - **партиционна (иодеона) хроматографија**;
- привлачењу између јонских сорбена и супротно наелектрисаних центара на стационарној фази - **јонско-измењивачка хроматографија**, или
- задржавању, односно пропуштању одвајаних супстанци на основу њихове величине и/или облика - **ексклузиона или гел-филтрациона хроматографија**.

При томе треба имати у виду да дато хроматографско одвајање најчешће представља комбинацију ових основних сепарационих механизма.

Проучавање механизма хроматографског одвајања супстанци од посебног је интереса у системима који садрже сорбенте на чијим се површинама налазе специфичне поларне функционалне групе способне за различите међумолекулске интеракције.

У хроматографији на танком слоју употребљавају се бројни сорбенти од којих су најзначајнији: си-

лика-гел, алуминијум-оксид, целулоза, полиамиди и хемијски модификовани силика-гелови. Поред ових и бројни други неоргански и органски сорбенти повремено су примењивани у танкослојној хроматографији.

Сорбенти који се примењују у хроматографији на танком слоју могу да се класификују на начин приказан у Таблици 1.

ТАБЛИЦА 1. Класификација сорбената који се примењују у хроматографији на танком слоју.

Класа сорбента	Типични представници
Поларни неоргански сорбенти	Силика-гел, алуминијум-оксид
Поларни органски сорбенти	Целулоза, полиамиди
Поларно модификовани силика-гелови	Амино-пропил-, цијано-пропил- модификовани силика-гел
Неполарно модификовани силика-гелови	Диметил-, октил-, октадецил-модификовани силика-гел

НЕОРГАНСКИ СОРБЕНТИ

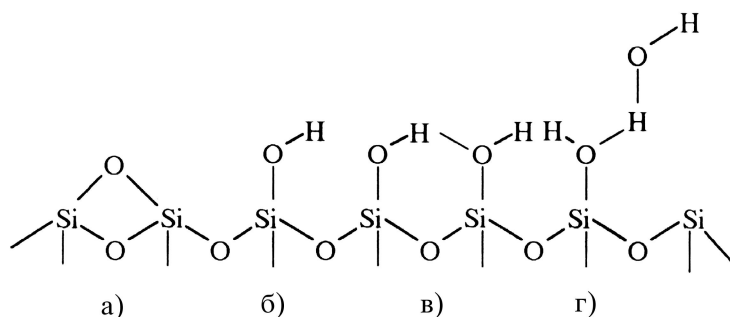
Силика-гел је несумњиво најчешће примењивани сорбент у хроматографији на танком слоју. Добија се спонтаном полимеризацијом и дехидратацијом воденог раствора силицијумове киселине настале додатком киселине у раствор натријум-силиката [4]. У зависности од експерименталних услова добијени производи се међусобно разликују по специфичној површини и порозности. За адсорпциону хроматографију погодни су средње порозни силика-гелови. Њих карактерише просечан пречник пора од 6-10 nm, релативно велика специфична површина од преко 200 m²/g и велика запремина пора (преко 0,7 cm³/g) [5].

На површини силика-гела може да буде присутно неколико различитих функционалних група [2, 4] за које се сматра да представљају активне центре у процесу хроматографског одвајања (Слика 1).

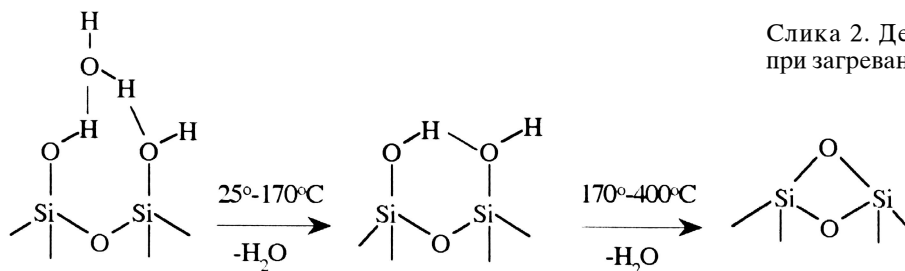
Степен покривености површине молекулима воде важан је параметар који одређује активност сорбента. Активирањем силика-гела загревањем до 170°C уклања се физички сорбована вода (Слика 2). Загревањем на вишим температурама долази до кондензовања суседних силанолних група при чему, уз издвајање воде, настају силоксанске групе. Оваква хидрофобизација силика-гела праћена је смањењем специфичне површине и губитком способности поновног везивања воде [6].

Адсорпциона својства силика-гела одређена су присуством силанолних група на његовој површини. Као могуће интеракције које одређују ретенцију одвајаних супстанци могу да се јаве водоничне везе, дипол-дипол и друге електростатичке интеракције [7]. Јачина поменутих интеракција зависи, пре свега, од броја ефективних силанолних група, структуре одвајаних супстанци, као и од елуционе моћи употребљене мобилне фазе. Како је густина силанолних група од око 8 μmol/m² константна за све типове силика-гелова [8], интензитет адсорпционих интеракција директно је пропорционалан специфичној површини сорбента. У условима адсорпционе хроматографије на силика-гелу сорбенти чији молекули садрже поларне или поларизабилне групе показују повећану ретенцију због јачих интеракција са сорбентом.

Осим велике примене у адсорпционој хроматографији, силика-гел се користи и као носач течне стационарне фазе у партиционој хроматографији. За ову сврху нарочито су погодни силика-гелови који имају велику запремину пора и малу специфичну површину. У идеалном случају партиционе хромато-



Слика 1. Функционалне групе на површини силика-гела: а) слободне силанолне, б) реакционо способне силанолне групе међусобно повезане водоничним везама, г) силанолне групе везане за молекул воде



Слика 2. Дехидратација силика-гела при загревању

графије, тј. када нема адсорпционих интеракција, ретенција супстанци зависи од одговарајућих подеоних коефицијената као и од запремина стационарне и мобилне фазе.

Алуминијум-оксид такође спада у поларне неорганске сорбенте. Добија се термичком дехидратацијом хидратисаног алуминијум-оксида. У зависности од особина полазног материјала и температуре на којој се врши дехидратација добијају се различите кристалне форме алуминијум-оксида. Оне карактеришу различите специфичне површине и величине пора па због тога имају и различите хроматографске особине [4]. За хроматографију на танком слоју погодна је γ -кристална модификација алуминијум-оксида. Специфична површина овог сорбента може да износи 100-350 m²/g, а просечан пречник пора 2-8 nm.

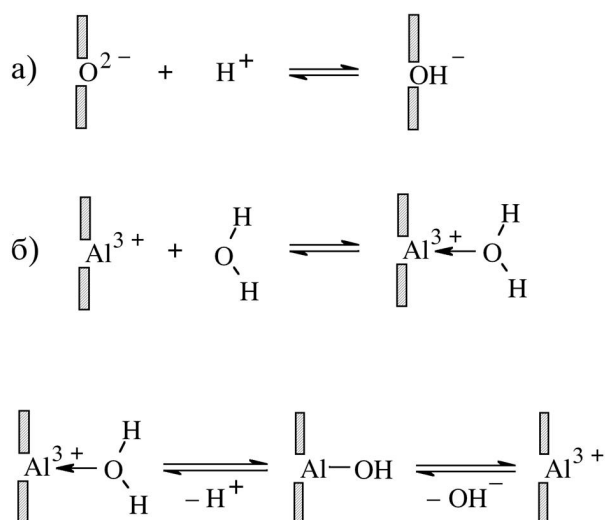
Загревањем сорбента на температурама између 100 и 200⁰С долази до његовог активирања. Овакав сорбент нарочито је погодан за адсорпциону хроматографију применом мање поларних растварача [9].

Хроматографске особине алуминијум-оксида и силика-гела су сличне, али се танак слој алуминијум-оксида одликује већом енергијом адсорпције молекула са двоструким угљеник-угљеник везама и бољом селективношћу одвајања ароматичних угљоводоника и њихових деривата. Механизам хроматографског одвајања супстанци на алуминијум-оксиду сложенији је него на силика-гелу. Сматра се да грађење водоничних веза између сорбенда и површинских хидроксилних група или атома кисеоника сорбента (Слика 3) нема значајније учешће у адсорпцији на алуминијум-оксиду [10]. Важне адсорпционе центре овог сорбента представљају Луисови (Lewis) кисели центри, који су одговорни за сорпцију већине поларних и незасићених једињења [11].

Комерцијално су доступне три врсте алуминијум-оксида за хроматографију на танком слоју: базни, кисели и неутрални. Базни алуминијум-оксид (рН-вредност 10% водене суспензије износи 9-10) има и особине катјонита. На њему може долазити до јаког везивања катјонских супстанци или до разлагања једињења осетљивих на дејство база. Кисели алуминијум-оксид (рН-вредност 10% водене суспензије износи 4-4,5) има особине анјонског измењивача, док неутрални алуминијум-оксид не показује јонско-измењивачка својства. Неутрални алуминијум-оксид најпогоднији је за одвајање супстанци осетљивих на дејство киселина и база.

Други неоргански сорбенти. Од бројних неорганских сорбената, који су повремено примењивани у хроматографији на танком слоју, најзначајнији су магнезијум-оксид и дијатомејска земља.

Магнезијум-оксид је поларни сорбент базног карактера који се може добити дехидратацијом магнезијум-хидроксида на различитим температурама. При загревању до 150⁰С магнезијум-хидроксид губи различите количине физички сорбоване воде. Ак-



Слика 3. Активни центри на површини алуминијум-оксида: а) Луисови кисели центри; б) Луисови базни центри

тивност сорбента расте при загревању до 350⁰С, а даљим загревањем на вишим температурама смањује се. Сматра се да важну улогу у механизму адсорпције на овом сорбенту имају површинске хидроксилне групе [12]. Пошто се на њему јако задржавају једињења са незасићеним везама угљеник-угљеник, магнезијум-оксид се примењује за одвајање супстанци које се међусобно разликују само по степену незасићења (олефини, поликондензована ароматична једињења и сл.) [13].

Дијатомејска земља (инфузоријска земља, киселџур) садржи као главну компоненту силицијум-диоксид. Одликује се малом специфичном површином (1-5 m²/g) и релативно великом запремином крупних пора. Овакве особине сорбента чине га одличним носачем течне стационарне фазе у партиционој хроматографији [9].

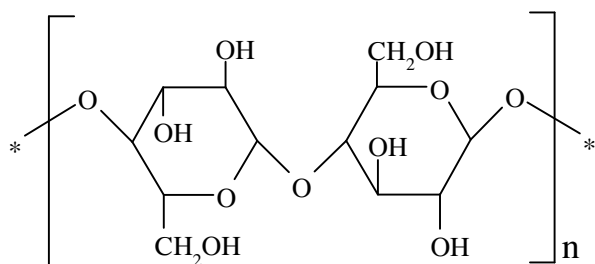
Осим наведених постоје и други неоргански сорбенти који се понекад примењују у хроматографији на танком слоју, најчешће ради решавања одређених практичних проблема [14].

ОРГАНСКИ СОРБЕНТИ

Целулоза је поларан органски сорбент често примењиван у хроматографији на танком слоју. То је макромолекулски полисахарид састављен од јединица целобиозе (Слика 4).

Присуство великог броја слободних хидроксилних група на површини целулозе омогућује везивање знатне количине воде из хроматографских растварања који садрже воду. Ово чини целулозу нарочито погодним сорбентом за одвајање хидрофилних супстанци и то најчешће нормално-фазном подеоном хроматографијом [9].

У хроматографији на танком слоју примењују се два основна типа целулозе: влакнаста и микрокристална. Хроматографске особине ова два сорбента



Слика 4. Део структуре целулозе

веома су сличне, али су зоне које се добијају на танким слојевима микрокристалне целулозе много компактније.

Хемијским модификацијама или импрегнасијом целулозе могу се добити различити јонски измењивачи, који се углавном користе за одвајање високомолекулских органских једињења (протеина, нуклеинских киселина и њихових деривата и сл.). Најпознатији јонски измењивачи на бази целулозе су:

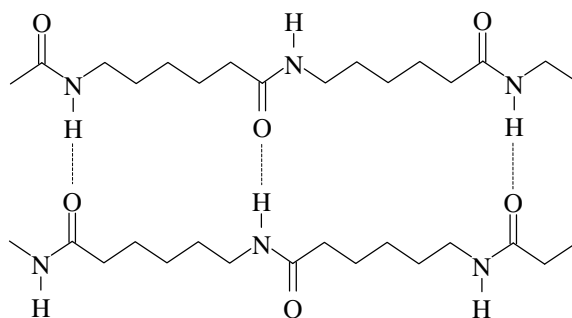
- Јако базни анјонити: **DEAE** (диетил-амино-етил) и **PEI** (полиетиленимино) целулоза,
- Слабо базни анјонит: **"Ecteola"**-целулоза,
- Јако кисели катјонит: **P**-целулоза или фосфориллована целулоза,
- Слабо кисели катјонит: **CM**-целулоза, односно карбоксиметил-целулоза.

За разлику од јонско-измењивачких смола на бази органских кополимера, одвајане супстанце на танким слојевима целулозних јонских измењивача показују нормално-фазни редослед, што је последица хидрофилности целулозног матрикса [11].

Други органски сорбенти. Многи органски сорбенти, попут неорганских, примењивани су повремено у хроматографији на танком слоју, нпр. хитин [15], кукурузни скроб [16] итд.

До сада, **полиамиди** су највише примењивани **синтетички органски полимери** у хроматографији на танком слоју. Могу се добити полимеризацијом лактама или поликондензацијом масних киселина са алифатичним аминима. Мада су комерцијално доступни различити полиамиди, у хроматографији на танком слоју најчешће се примењује полиамид 6 (ε-поликапролактан) (Слика 5).

Одвајање супстанци на полиамиду, теоријски, може да се заснива на адсорпцији, партиципији или јонској измени [6]. Важни адсорпциони центри овог сорбента су површинске амидне групе преко којих може да гради водоничне везе са одвајаним супстанцама. Ове интеракције полиамид може да остварује делујући као акцептор водоника (преко –СО-група) или његов донор (преко –NH-група). Овај сорбент нарочито је погодан за одвајање супстанци које садрже протон-донорне групе, као што су феноли, сулфонске киселине, анилини, угљени хидрати и др. По-



Слика 5. Део структуре полиамида 6

ред тога, полиамид може да остварује неспецифичне хидрофобне интеракције са хидрофобним деловима одвајаних супстанци преко алкил-низова који одвајају амидне групе, односно да се, у комбинацији са поларним воденим растварачима, примени као неполарна (реверзно-фазна) стационарна фаза. Међутим, када поликомпонентни растварач као једину поларну компоненту садржи сирћетну киселину, ова се везује за сорбент градећи поларну стационарну фазу, што омогућава одвајање супстанци нормално-фазном подеоном хроматографијом. Најзад, применом киселих водених растварача амидна –NH-група може бити протонизована, што чини сорбент способним да, на бази јонске измене, сорбује анјонске супстанце.

Други синтетички органски полимери, мада ређе, примењивани су као сорбенти у хроматографији на танком слоју – нпр. полиакрилонитрилни сорбент [17, 18], кополимери на бази стирена и дивинил-бензена, односно метакрилата [19], поливинил-ацетат [20], полиетилен [21], поливинилпиролидон [22], аминопласт [23].

ХЕМИЈСКИ МОДИФИКОВАНИ СИЛИКА-ГЕЛОВИ

Хемијски модификовани силика-гелови седамдесетих година уведени су у хроматографију у колони – временом налазе све већу примену као сорбенти и у хроматографији на танком слоју. Добијају се реакцијом површинских силанолних група силика-гела са различитим органским и органо-силиконским једињењима.

Особине хемијски модификованих силика-гелова зависе како од карактеристика органског модификатора, тако и од физичких особина употребљеног силика-гела. При реакцијама модификације, услед стерних сметњи и других фактора, 40-50% силанолних група остаје непромењено. Због њиховог присуства са једне, и модификацијом унетих функционалних група са друге стране, хемијски модификовани силика-гелови представљају сорбенте са бифункционалном површином. При разматрању механизма одвајања различитих супстанци на таквим сорбентима о овоме се мора водити рачуна.

Немодификоване силанолне групе

Диметил-модификовани (C₂) силика-гел

Октил-модификовани (C₈) силика-гел

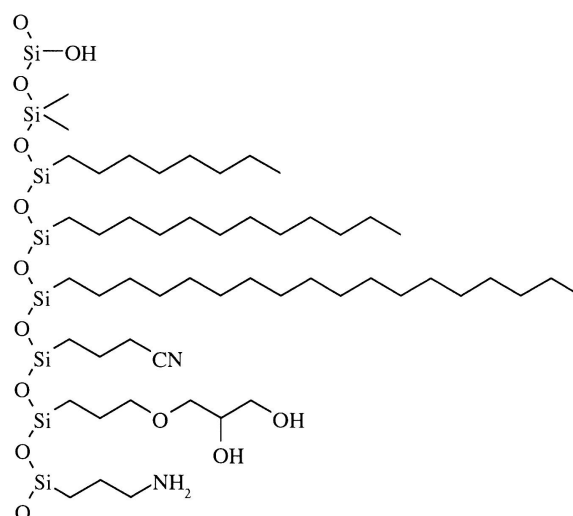
Додецил-модификовани (C₁₂) силика-гел

Октадецил-модификовани (C₁₈) силика-гел

Цијано-пропил-модификовани силика-гел

Диол-модификовани силика-гел

Амино-модификовани силика-гел



Слика 6. Површинске функционалне групе неких хемијски модификованих силика-гелова

Површинске групе хемијски модификованих силика-гелова, који се најчешће примењују као сорбенти у хроматографији на танком слоју приказане су на Слици 6.

Модификовани силика-гелови који садрже не-поларне групе, најчешће **диметил-** (C₂), **октил-** (C₈), **додецил-** (C₁₂) или **октадецил-** (C₁₈) угљоводоничне низове, комбиновани са поларним мобилним фазама примењују се као сорбенти у реверзно-фазној хроматографији. Овакви системи погодни су за одвајање супстанци које су растворне у релативно поларним растварачима и чија је сорпција из таквих растварача слаба на поларним сорбентима. Осим тога, могу се применити за одвајање неполарних једињења која се слабо сорбују на поларним сорбентима из неполарних растварача [5].

Механизам хроматографског одвајања на алкил-модификованим силика-геловима још увек није потпуно разјашњен [24]. Сматра се да следећи процеси могу да имају значајан утицај на ретенцију одвајаних супстанци:

- **Солвофобне (хидрофобне) интеракције** између сорбенда и стационарне фазе,
- **Силанофилне интеракције** између сорбенда и немодификованих површинских силанолних група сорбента, и
- **Солватација** сорбенда и/или стационарне фазе органском компонентом растварача.

Солвофобне (хидрофобне) интеракције су најзначајније у растварачима са високим садржајем воде, какви се често користе у реверзно-фазној хроматографији. Сматра се да се сепарациони механизам под овим условима заснива на реверзибилној асоцијацији молекула сорбенда са угљоводоничним површинским групама сорбента [25]. Јачину ове асоцијације одређују следећи параметри:

- Укупна угљоводонична површина сорбенда (ретенција расте са повећањем броја хидрофобних група у молекулу сорбенда),

- Укупна угљоводонична површина везаних алкил-група (ретенција расте са продужетком *n*-алкил-низа), и
- Поларне интеракције између сорбенда и мобилне фазе (присуство поларних група у молекулу сорбенда смањује ретенцију).

Немодификоване силанолне групе могу да изазивају развлачење хроматографских зона, а у неким случајевима повећавају селективност система – нарочито при одвајању поларних сорбена. Због њиховог присуства на површини сорбента могућа су, у зависности од поларности мобилне фазе, два ретенциона механизма која се заснивају на солвофобним односно силанофилним интеракцијама [26].

Међу хидрофилно модификованим силика-геловима највећу примену у хроматографији на танком слоју имају **цијано-пропил-**, **амино-пропил-** и **диол-**модификовани силика-гелови. Поларне функционалне групе, код свих ових сорбената, везане су за матрикс силика-гела помоћу кратког неполарног дела. Преко поларних група ови сорбенти остварују специфичне интеракције са сорбентима (нормално-фазна хроматографија), а присуство неполарних угљоводоничних делова на њиховој површини, омогућава примену и у реверзно-фазној хроматографији.

С обзиром на растући интерес за примену хемијски модификованих силика-гелова, у литератури се могу наћи многобројни радови из ове области [11].

ХИРАЛНЕ СТАЦИОНАРНЕ ФАЗЕ

Одвајање енантиомера течном хроматографијом применом хиралних стационарних фаза засновано је на грађењу реверзибилних дијастереомерних комплекса различите стабилности између сорбенда и стационарне фазе. Како је грађење комплекса условљено структуром узорка, не постоје универзалне хиралне стационарне фазе. Предности танкослојне хроматографије као методе за одвајање

енантиомера последица су њене ниске цене, лакоће извођења и брзине. Међутим, основни недостатак, нарочито у поређењу са течном хроматографијом у колони, је мали број доступних стационарних фаза [27].

Најшире примењивани приступ одвајању енантиомера у условима хроматографије на танком слоју заснован је на механизму лигандне измене применом комерцијално доступних реверзно-фазних плоча импрегнисаних растворима бакар-ацетата и хиралних селектора на бази аминокиселина [7]. Енантиомери се одвајају на основу разлике у стабилности дијастереомерних комплекса наглађених између одвајаних супстанци, бакра и хиралног селектора. Овакви хроматографски системи примењени су за одвајање аминокиселина и њихових деривата, као и неких α -супституисаних карбоксилних киселина.

Abstract

SORBENTS IN THIN – LAYER CHROMATOGRAPHY

Dužanka Milojković-Opsenica,

Faculty of Chemistry, Belgrade, Yugoslavia

Thin-layer chromatography (TLC) is a simple, rapid, sensitive and inexpensive analytical method for the separation and identification of various substances. During the chromatographic process components to be separated are distributed between two phases one of which is stationary while the other is mobile phase. The mobile phase in TLC is a liquid, containing a single solvent or a mixture of solvents. The stationary phase is a porous solid, known as the sorbent, which is situated as a thin layer on the surface of a flat plate. Numerous inorganic and organic sorbents are available, such as silica, alumina, cellulose, polyamides, chemically modified sorbents. In this paper some commonly used sorbents are described.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.V. Kiselev and J. Jasin, Gas- und Flüssigadsorptions-chromatographie, Huthig, 1985.
2. J.M. Miller, Chromatography: Concepts and Contrasts, John Wiley & Sons, 1988.
3. R. Kaliszan in: Ph.R. Brown and R.A.Hartwick (Eds.), High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, 1989.
4. F. Geiss, Fundamentals of Thin-Layer Chromatography (Planar Chromatography), Huthig, Heidelberg, 1987.
5. H. Engelhardt, High Performance Liquid Chromatography, Springer, 1979.
6. S. Gocan in: N. Grinberg (Ed.), Modern Thin-Layer Chromatography, Marcel Dekker, 1990.
7. H.E. Hauck, M. Mack and W. Jost, Chromatogr. Sci., 55 (1991) 87.
8. H.P. Boehm, Angew. Chem., 78 (1966) 617.
9. B. Fried and J. Sherma, Thin-Layer Chromatography, Marcel Dekker, 1990.
10. L.R. Snyder, J. Chromatogr., 23 (1966) 388.
11. K.K. Unger and U. Trudinger in: Ph.R. Brown and R.A.Hartwick (Eds.), High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, 1989.
12. L.R. Snyder, J. Chromatogr., 28 (1967) 300.
13. S. Perri, R. Amos and P. Bryner, Prakticheskoe Rukovodstvo po Zhidkostnoi Khromatografii, Mir, Moskva, 1974.
14. Yu. Kirkhner, Tonkosloinaya Khromatografiya, Mir, Moskva, 1981.
15. J.K. Rozylo, D. Gwis-Chomisz and I. Malinowska, J. Planar Chromatogr. – Modern TLC, 1 (1988) 235.
16. V.D. Canić, M.N. Turčić, M.B. Bugarski-Vojinović and N.U. Perišić, Z. Anal. Chem., 229 (1967) 93, i reference citirane u njemu.
17. D.M. Milojković-Opsenica, M.J. Malinar and Ž.Lj. Tešić, J. Chromatogr. A, 847 (1999) 291, i reference citirane u njemu.
18. Ž.Lj. Tešić, R.M. Baošić and D.M. Milojković-Opsenica, Ibid., 303.
19. D.J. Pietrzyk, T.D. Rotsch and S.W. Chan Leuthauser, J. Chromatogr. Sci., 17 (1979) 555.
20. J.H. Dohnt, G.J.C. Mulders-Dijkman, J.C. De Beauver and G.G. Kuippers, J. Chromatogr., 52 (1970) 429.
21. H.K. Mangold, J. Am. Oil Soc., 38 (1961) 708.
22. J.M. Dalman, J.M. Pla-Delfina and A. Del Pozo Ojeda, J. Chromatogr., 78 (1973) 165.
23. S.M. Petrović, N.U. Perišić-Janjić, M. Popović and L. Kolarov, J. Planar Chromatogr. – Modern TLC, 3 (1990) 61.
24. M.T. Gilbert, High Performance Liquid Chromatography, Wright, Bristol, 1987.
25. Sz. Horvath, W. Melander and J. Molnar, J. Chromatogr., 125 (1976) 129.
26. A. Nahum and Sz. Horvath, J. Chromatogr., 203 (1981) 53.
27. C.F. Poole and S.K. Poole, Chromatography Today, Elsevier, Amsterdam, 1991.